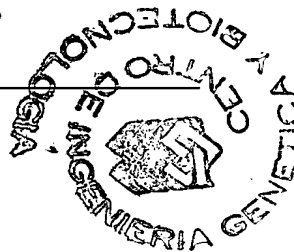


## DECLARATION

I, Julio César Aguilar Rubido  
Translator, of the CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y  
BIOTECNOLOGIA, Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa,  
C. Habana 10600, Cuba, do solemnly and sincerely declare  
that I am conversant with the English and Spanish  
languages and am a competent translator thereof, and that  
the annexed document is, to the best of my knowledge and  
belief, a complete, true and correct translation of the  
International Patent Application PCT/CU99/00006 made in  
Cuba filed on December 1, 1999.

Date: April 2, 2001.

Signature: \_\_\_\_\_



09/ 857402

JC03 Rec'd PCT/PTO

01 JUN 2001

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

CV 99/00006



PCT/CV 99/00006

REC'D 28 DEC 1999

WIPO PCT

REPÚBLICA DE CUBA

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

097857402



Lic. América N. Santos Riveras, Directora General de la  
**OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.**

**CERTIFICO:** Que bajo el número ciento ochenta y tres del año mil novecientos noventa y ocho del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL**, solicitud de Certificado de Autor de Invención por **FORMULACIONES CONTENIENDO PARTICULAS SEMEJANTES A VIRUS COMO INMUNOPOTENCIADORES POR VIA MUCOSAL**, con fecha dos de diciembre de mil novecientos noventa y ocho, a las trece horas y treinta minutos pasado meridiano, por Mariela Vázquez Castillo, Representante, ciudadana cubana, a nombre y en representación del **CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA (CIGB)**, cuya invención fue creada por Julio César Aguilar Rubido; Daniel Octavio Palenzuela Gardon; Verena Lucila Muzio González; Gerardo Enrique Guillén Nieto; Eduardo Pentón Arias; Dagmara Pichardo Díaz; Enrique Iglesias Pérez.

**ASIMISMO CERTIFICO:** Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

**TAMBIEN CERTIFICO:** Que la Memoria Descriptiva, Reivindicaciones y Dibujos que se acompañan, son exactamente iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de Mariela Vázquez Castillo, Representante, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los veintitrés días del mes de noviembre de mil novecientos noventa y nueve.

  
Lic. América N. Santos Riveras  
Directora General

**MEMORIA DESCRIPTIVA:****FORMULACIONES CONTENIENDO PARTÍCULAS SEMEJANTES A VIRUS COMO INMUNOPOTENCIADORES POR VIA MUCOSAL.**

La presente invención está relacionada con la rama de la medicina, particularmente con el uso de nuevas formulaciones de adyuvantes con antígenos vacunales. En este caso, el adyuvante es una partícula semejante a virus (VLP), que al mismo tiempo constituye un antígeno de interés en la formulación. El mecanismo de adyuvación se basa en un efecto positivo de un antígeno sobre otro o en una interacción sinérgica entre los antígenos de la formulación.

El objetivo técnico que se persigue con la invención propuesta es, precisamente, el desarrollo de formulaciones capaces de potenciar la respuesta inmune a antígenos administrados por vía mucosal, minimizando el número de componentes de la formulación al punto de que la actividad potenciadora se basa en las interacciones entre las mismas partículas a nivel mucosal, por una ruta capaz de generar una inmunidad mucosal y sistémica. Además, el desarrollo de vacunas combinadas para la vía mucosal que tienen como antígeno central al HBsAg, capaz de incrementar la respuesta a antígenos coadministrados. La ventaja obvia es la eliminación de cualquier otro elemento ajeno a los antígenos de interés y la utilización de una vía que permite un incremento de la respuesta inmune con el incremento en el número de antígenos inoculados. Consideramos que esta es una base o núcleo para el desarrollo de vacunas combinadas para uso mucosal.

El HBcAg es extremadamente inmunogénico durante la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) o luego de inmunización con el mismo. En muchos enfermos crónicos con el VHB, éste es el único antígeno capaz de generar una respuesta inmune. Aun en cantidades de nanogramos puede producir anticuerpos en ratones. Recientemente, varios estudios estructurales han revelado un número de características que ayudan a explicar su potente inmunogenicidad. Este antígeno se une específicamente a receptores inmunoglobulínicos de membrana para un alto número de células B murinas

en reposo y en cantidad suficiente para inducir las moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2. De esta forma las células B no sensibilizadas, específicas para HBcAg pueden tomar, procesar y presentar al HBcAg a células T auxiliaadoras vírgenes *in vivo* y a hibridomas de células T *in vitro* aproximadamente  $10^5$  veces más eficientemente que los macrófagos y células dendríticas. Esta relación estructura función explica la gran inmunogenicidad del HBcAg (Milich, D.R. *et al.* 1997 Proc. Natl. Acad. Sci USA Dec23; 94(26): 14648-53).

Estudios bioquímicos y serológicos indican que la resolución de la infección aguda por el virus de la hepatitis B ocurre en el contexto de una eficiente respuesta inmune mediada por células, mientras que la infección crónica se caracteriza por una pobre e indetectable respuesta inmune mediada por células y una inmunidad humoral "relativamente eficiente".

La inmunidad humoral y la mediada por células son reguladas por diferentes grupos de células T auxiliaadoras. Un examen en un modelo murino acerca de los factores que influyen la inducción de células T auxiliaadoras de tipo 1 (Th1) o de tipo 2 (Th2) para los antígenos de la nucleocápsida del VHB (HBcAg/HBeAg) reveló que dicho balance estaba influido por (1) la estructura del antígeno (HBcAg es particulado y el HBeAg es soluble); (2) el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) del hospedero y los sitios de células T que eran reconocidos; (3) la regulación cruzada entre las células Th1 y Th2; (4) la tolerancia de células T, que es más completa para Th1 que para Th2; (5) el HBeAg secretado que delecta preferencialmente las células Th1 y (6) el tratamiento con citoquinas, que *in vivo* sesgó la predominancia de la respuesta hacia una respuesta Th1 o Th2. Este balance Th1/Th2 de la respuesta es relevante para el curso agudo o crónico de la infección. Las células Th2 evaden preferencialmente la inducción de tolerancia en comparación con su contraparte Th1. Dado que el HBeAg puede actuar como un tolerógeno durante la transmisión vertical del virus de la hepatitis B, eliminando las células Th1, la predominancia de células Th2 específicas para HBeAg puede influir en la iniciación y mantenimiento del estado de portador crónico. En este caso la terapia con citoquinas con el objetivo de variar la respuesta Th2 a Th1, pudiera ser beneficiosa en el tratamiento de la infección crónica con hepatitis B (Milich, D.R. 1997 J. Viral. Hepat.; 4 Suppl 2: 48-59).

El efecto de la circulación del HBeAg sobre las células Th1 específicas para HBcAg se examinó transfiriendo células T específicas para HBe/HBcAg en ratones transgénicos dobles para HBeAg y HBcAg. La presencia de HBeAg sérico eliminó la respuesta anti HBcAg mediada por células Th1 y la cambió en dirección al fenotipo Th2. Este resultado sugiere que, en un contexto de infección por hepatitis B, el HBeAg circulante tiene el potencial de eliminar preferencialmente las células Th1 específicas de la respuesta inflamatoria anti-HBeAg y anti-HBcAg, necesaria para el aclaramiento viral, promoviendo la persistencia del virus de la hepatitis B (Milich-DR *et al.* 1998 J-Immunol. Feb 15; 160(4): 2013-21).

Se conoce que los anticuerpos anti-HBcAg están presentes desde el inicio de la enfermedad y alcanzan altas concentraciones en el suero de pacientes crónicamente infectados con el VHB, pero estos anticuerpos no protegen. Los anticuerpos anti-HBc transmitidos pasivamente a recién nacidos de madres que son portadoras crónicas del VHB, no protegen a estos niños de la infección por dicho virus. (Beasley *et al.* 1977 American Journal of Epidemiology 105: 914-918). Sin embargo, se ha demostrado que la inmunización de chimpancés con antígeno de la nucleocápsida protegió parcial o completamente de la infección por el VHB (Iwarson, S. *et al.* 1985 Gastroenterology 88: 763-767; Murray, K. *et al.* 1987 Journal of Medical Virology 23: 101-107). En el estudio de Iwarson, tres chimpancés fueron completamente protegidos. Luego del reto con el VHB, se incrementaron los niveles de anticuerpos anti HBc y anti HBe pero solo un animal seroconvirtió para anti-HBs. En el estudio de Murray, 2 de 4 chimpancés inmunizados mostraron un bajo nivel de replicación viral luego del reto, el HBsAg fue detectable en el suero por 2 o 3 semanas y luego estos chimpancés desarrollaron una respuesta anti-HBs. Se hipotetizó que la protección incompleta pudo estar dada por la baja respuesta inmune en los animales vacunados sin adyuvante.

Luego de la inmunización con el antígeno de la nucleocápsida del virus de la hepatitis de marmotas (WHcAg) en Adyuvante Completo de Freund (ACF), se pudo comprobar que la inmunogenicidad para la proteína de la nucleocápsida fue capaz de proteger contra reto con el virus (WHV) sin que hubiese detección de anticuerpos contra la proteína de superficie (WHs) ni síntomas de infección.

Aunque no se descarta la posibilidad de que la protección estuviera mediada por anticuerpos anti-proteína de superficie no detectables ayudados por la respuesta Th anti-nucleocápside, se consideró la actividad citotóxica como responsable de la protección encontrada (Roos, S. *et al.* 1989 J. Gen. Virol. 70, 2087-2095). En un segundo estudio con marmotas se esclareció el papel del HBcAg y el WHcAg en la protección así como el posible mecanismo. Las marmotas fueron inmunizadas con WHcAg y HBcAg y retadas posteriormente con una dosis alta del virus de marmotas. En este experimento se encontró que el WHcAg es un antígeno protector y que existe una protección cruzada ya que 4 de 6 marmotas inmunizadas con HBcAg estaban protegidas de la infección por el virus de la hepatitis de marmotas. Ambos antígenos generaron altos títulos de anticuerpos con una reactividad cruzada menor del 1%, lo que confirma los reportes de protección con antígenos internos del virus de la hepatitis B. Como los epítopes B dominantes de ambos antígenos no parecen ser conservados, este resultado también demuestra que los anticuerpos no son importantes para la protección. Las marmotas inmunizadas con WHcAg/HBcAg reaccionaron con una rápida respuesta de anticuerpos séricos contra proteínas de la superficie viral luego del reto con el virus de la hepatitis de marmotas, indicativo de una ayuda de células T como potencial mecanismo de protección luego de una inmunización con un antígeno viral interno. (Schodel-F *et al.* Vaccine. 1993; 11(6): 624-8)

La transfección con ADN dimérico del VHB de líneas celulares establecidas de hígado de ratón BALB/C (líneas ML) resultó en la expresión en estas líneas de antígenos del virus de la hepatitis B. La transferencia adoptiva de las células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con células ML-1.1 expresando tanto el HBsAg como el HBcAg, causó la regresión de las células tumorales que expresan los antígenos correspondientes en ratones desnudos. En adición, la transferencia de células de bazo de ratones BALB/c inmunizados con el HBsAg o el HBcAg también causó regresión tumoral. Estos resultados demuestran que el antígeno de superficie y el antígeno de la nucleocápsida pueden inducir una inmunidad que conduce a la regresión del carcinoma hepatocelular in vivo. (Chen, S.H. *et al.* 1993 Cancer-Res. Oct 1; 53(19): 4648-51)

En la actualidad se encuentran en estudios clínicos fase II/III vacunas terapéuticas consistentes en polipéptidos con epítopes de la nucleocápsida de la hepatitis B específicos para el HLA humano. (Liaw, Y.F. 1997 J.Gastroenterol. Hepatol. Oct; 12(9-10) S227-35).

El efecto "carrier", definido como la provisión de sitios de reconocimiento de células T, físicamente unidos a epítopes para células B para proveer una ayuda T a la síntesis de anticuerpos, tiene en el HBcAg un buen ejemplo de proteína portadora. El HBcAg representa un antígeno altamente inmunogénico en humanos así como en modelos animales. Su capacidad para activar directamente células B y generar fuertes respuestas de células T, además de su eficiente procesamiento y presentación por células presentadoras de antígenos sugieren que el HBcAg puede ser una molécula portadora ideal. Por tanto un número grande de epítopes homólogos y heterólogos han sido conjugados químicamente o fusionados genéticamente al HBcAg por métodos recombinantes para incrementar su inmunogenicidad. Estas estrategias han tenido éxito. Se han diseñado vectores de expresión en bacterias que permiten la inserción de epítopes B heterólogos en varias posiciones dentro de las partículas de HBcAg y la purificación eficiente de las partículas híbridas.

Los estudios de posición de epítopes B demostraron que una inserción interna cerca del aminoácido 80 continúa siendo inmunodominante permitiendo un incremento en la producción de anticuerpos con respecto a las otras proteínas de fusión. Se han realizado estudios de inmunogenicidad con reto experimental en varios sistemas. Por ejemplo, una secuencia del Circunsporozoito *Plasmodium berghei* fue insertada en dicho sitio y la partícula híbrida purificada HBcAg/CS fue altamente inmunogénica y protegió al 100% de los ratones retados experimentalmente contra la malaria. Con el propósito de desarrollar vacunas orales han sido utilizadas especies vivas avirulentas de *Salmonella* para introducir genes que codifican para las partículas híbridas de HBcAg (Milich, D.R. *et al.* 1995 Ann. N.Y. Acad. Sci. May 31; 754: 187-201).

En resumen, aparte de la relación del HBcAg con la protección, evidenciada total o parcialmente en chimpancés o indirectamente referida por los experimentos con WHcAg, esta proteína posee un número de características que la hacen única. Puede comportarse como un antígeno T dependiente y T



independiente (Milich, D.R. *et al.* 1986 Science 234, 1398-1401), es muy inmunogénica, incluso sin la ayuda de adyuvantes- y su inoculación sensibiliza preferencialmente células Th1 (Milich, D.R. *et al.* 1997, J. Virol. 71, 2192-2201). Ha demostrado ser muy eficiente como proteína portadora de epítopes heterólogos (Schödel, F. *et al.* 1992 J. Virol. 66: 106-114; Milich-DR *et al.* 1995 Ann-N-Y-Acad-Sci. May 31; 754: 187-20) y las células T auxiliaadoras (Th) específicas para ella median la respuesta de anticuerpos tanto anti-HBcAg como anti-HBsAg (Milich, D.R. *et al.* 1987 Nature (London) 329: 547-549). Estas características inmunológicas son únicas para el HBcAg particulado y no pertenecen a la forma no particulada de esta proteína, el HBeAg (Milich, D.R. *et al.* 1997 Proc. Natl. Acad. Sci USA Dec 23; 94(26): 14648-53).

### **Descripción detallada de la invención**

En el trabajo objeto de la presente invención se reporta por primera vez una formulación para uso vacunal cuyos componentes fundamentales son el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y el antígeno de la nucleocápsida del mismo virus o derivados de ambos antígenos, obtenidos por ingeniería genética o conjugación química en proporciones adecuadas. Otros componentes son los estabilizadores y preservos.

La formulación HBsAg/HBcAg es novedosa por la potenciación de la respuesta anti antígeno de superficie que se genera al mezclar el antígeno de la nucleocápsida. Ambos antígenos son componentes del virus de la hepatitis B. Por tanto, el papel del adyuvante lo toma otro antígeno del virus, atractivo *per se* como antígeno vacunal, por lo que se amplía el espectro de la respuesta anti-hepatitis B generada por la formulación vacunal. Otras formulaciones de combinaciones con antígenos de nucleocápsidas, como es el caso de HBsAg/VLP del virus del papiloma humano y por extensión de otros antígenos de cápsidas virales con otras VLP, resultan en un incremento de los títulos para ambos antígenos. Producto de la mezcla del HBsAg con otros antígenos de nucleocápside, juntos o por separado (ejemplo 4), se pudo evidenciar un incremento en la inmunogenicidad sobre otros antígenos coinoculados, lo que evidencia un efecto sinérgico producto de la combinación con el HBsAg. En general, estos resultados permiten la generación de vacunas combinadas a nivel mucosal teniendo como núcleo al HBsAg y permiten además el

aprovechamiento de las interacciones positivas inter VLP, considerando las VLP como estructuras proteicas o lipoproteicas organizadas, semejantes a virus, del orden de los nanómetros.

En el caso de la coinoculación del antígeno de superficie y el antígeno de la nucleocápsida del virus de la hepatitis B, se podría generar entonces un producto con mejores características que la vacuna actual contra el virus de la hepatitis B dado que:

- Es posible ampliar el espectro de la respuesta inmune generada porque el HBcAg es considerado como antígeno importante *per se* para la protección anti-VHB. Además, la respuesta inmune anti-HBsAg que se alcanza con la inoculación mucosal a nivel de IgG sérica es tan intensa como la obtenida por la inoculación sistémica en alúmina.
- Entre las ventajas del nuevo producto están las facilidades que ofrece la ruta de inmunización -inmunidad sistémica e inmunidad de mucosas al mismo tiempo, la eliminación de los requerimientos de esterilidad y pirógenos así como la posibilidad de eliminar los costos relacionados con la inyección y toda la logística relacionada con la misma.
- Es posible aprovechar la actividad "carrier" del HBcAg en la misma formulación e introducir de esta forma antígenos importantes para la protección contra otras enfermedades.
- En general se aprecia la disminución en el número y exigencias en los controles de calidad, lo cual reduce los costos.
- Se eliminan los efectos tóxicos generados por la alúmina y los daños relacionados con la inyección.
- Es posible utilizar la formulación inicial del HBsAg y el HBcAg como núcleo de vacunas combinadas o múltiples donde se puede aprovechar tanto las propiedades adyuvantes del HBcAg así como las propiedades portadoras de ambos antígenos particulados. Los antígenos a introducir pueden ser homólogos o heterólogos.
- Es posible con esta preparación, favorecida aun más por la ruta de inoculación y por la introducción de otro antígeno que *per se* confiere determinado grado de protección, vacunar a los no respondedores para el antígeno de superficie.

-Las características de esta formulación la hacen apropiada para su introducción en la terapéutica.

En el segundo caso, los antígenos de nucleocápsida favorecedores de un incremento de la inmunogenicidad de otros antígenos coinoculados. Encontramos una gran simplicidad en las formulaciones resultantes y a la vez el incremento en la valencia de estas vacunas con un número mínimo total de antígenos y la posibilidad de eliminar el uso de adyuvantes que introducen antígenos no interesantes para la protección. De esta forma se pueden obtener formulaciones tan reducidas como combinaciones de la nucleocápsida de un virus con su antígeno de superficie, como es el primer caso, hasta formulaciones de nucleocápsidas de un virus con antígenos no capsidares de otro. Se pueden obtener además, combinaciones de antígenos de una mayor complejidad, pero siempre utilizando este efecto novedoso que se describe en los ejemplos donde se demuestra que es posible potenciar antígenos del mismo patógeno, u otro no necesariamente viral -y de cualquier naturaleza-, usando nucleocápsides virales mezcladas, no asociadas covalentemente.

En un tercer caso, es posible la generación de vacunas combinadas que tengan como núcleo al HBsAg cuyo efecto inmunopotenciador sobre otros antígenos coinoculados queda demostrado en el ejemplo 4. Las ventajas de estas formulaciones están dadas por la asociación efectiva del HBsAg, antígeno central de la vacuna anti VHB, con otros antígenos, con los que se demostró un efecto sinérgico en la respuesta generada para ambos antígenos. Este hecho, además de poseer lo atractivo de las variantes descritas anteriormente, posibilita que sea el HBsAg, antígeno protector contra una enfermedad de amplia distribución mundial, el antígeno central de las formulaciones.

En general, con respecto a otras vacunas mucosales, es posible señalar las siguientes ventajas:

- El proceso de adyuvación es por mezcla simple, no requiere garantizar adsorción del antígeno y la cantidad de HBcAg u otro antígeno de nucleocápsida, está al nivel del HBsAg.

- Es permisible la filtración como método de esterilización lo cual no es posible para muchos adyuvantes mucosales, fundamentalmente los particulados por encima de los 0.2µm.

-La sencillez del proceso de producción y los altos niveles de expresión con que se produce el HBcAg en *E. coli* permiten la obtención de grandes cantidades con bajos costos en comparación con otros adyuvantes mucosales.

Las formulaciones objeto de esta invención pueden presentar, en dependencia de la ruta de inoculación y las especies a inmunizar, volúmenes de 0.01 hasta 10mL. La dosis de los antígenos no capsidares puede variar entre 0.001 a 1mg, rango en que también se encuentra la dosis del antígeno de la nucleocápsida o sus derivados en la formulación vacunal final.

## EJEMPLOS DE REALIZACION

### Ejemplo 1

Con el objetivo de evaluar la inmunogenicidad del HBcAg, por vía intranasal, se inocularon 3 grupos de 8 ratones BALB/c hembras con una dosis de 10 $\mu$ g de antígeno en todos los casos. El primer grupo se inoculó con el antígeno en acemanano (CIGB, La Habana) 3mg/mL (peso liofilizado), adyuvante usado para la inmunopotenciación de sistemas particulados por vía nasal. El grupo 2 se inoculó con el HBcAg en solución tampón fosfato-salina (PBS). Al grupo 3 se le inyectó el antígeno en alúmina por vía subcutánea y se utilizó como grupo control de inoculación sistémica. El esquema seguido fue de inoculaciones los días 0, 14 y 28 y la extracción se realizó el día 42. La respuesta de anticuerpos se cuantificó por ensayo inmuno-enzimático (ELISA) para la determinación de IgG anti-HBcAg en suero.

El análisis estadístico de los resultados se realizó por el test de Student:  $p < 0.05$  se consideró diferencia significativa.

Se demostró que con el uso de acemanano no fue posible incrementar la respuesta inmune al HBcAg, ya que el antígeno en PBS generó una respuesta similar a la obtenida usando el acemanano como inmunopotenciador (Fig. 1). Las respuestas luego de inoculación nasal tanto en acemanano como en PBS no difirieron significativamente de la obtenida por el antígeno en alúmina por vía subcutánea. Este resultado avala el uso intranasal del HBcAg.

### **Ejemplo 2**

Con el objetivo de demostrar la actividad inmunopotenciadora del HBcAg sobre el HBsAg por vía intranasal, se ensayaron 4 grupos de 8 ratones BALB/c hembras. El esquema tuvo 2 inoculaciones los días 0 y 14. La extracción se realizó el día 21. El grupo 1 se inoculó con 10 $\mu$ g de HBsAg en PBS, el grupo 2 con 10 $\mu$ g de HBsAg en acemanano (CIGB, La Habana) 3mg/mL (peso liofilizado), el grupo 3 con 10 $\mu$ g de HBsAg y 10 $\mu$ g de HBcAg. Como control sistémico se utilizó el grupo 4, donde se inocularon 10 $\mu$ g de HBsAg en alúmina por vía subcutánea (Fig. 2).

El análisis estadístico de los resultados se realizó por el test de Student:  $p < 0.05$  se consideró diferencia significativa.

De este experimento se evidenció que es posible potenciar la respuesta anti-HBsAg con la coinoculación por vía mucosal, en este caso intranasal, del HBsAg y el HBcAg. La respuesta fue significativamente superior con respecto al grupo donde se inoculó al HBsAg en PBS y similar a la alcanzada por el grupo en que se inoculó al HBsAg en acemanano. La inoculación sistémica del HBsAg en alúmina tampoco difirió significativamente de los grupos inoculados con acemanano por vía nasal y con HBcAg por la misma vía.

### **Ejemplo 3**

Con el objetivo de estudiar el efecto potenciador del HBcAg a diferentes dosis en el modelo murino, se seleccionaron 6 grupos de 6 ratones BALB/c hembras. El esquema que se siguió fue: inoculación los días 0, 14 y 28 y extracción los días 26 y 42. Los grupos ensayados se correspondieron con: (1) 5  $\mu$ g de HBsAg en PBS vía nasal; (2, 3 y 4) 5  $\mu$ g de HBsAg con 5, 10 y 20 $\mu$ g de HBcAg respectivamente vía nasal, (5) 5 $\mu$ g de HBsAg en acemanano 3mg/mL vía nasal y (6) 5 $\mu$ g de HBsAg en alúmina 0.5mg/mL por vía intramuscular.

El análisis estadístico de los resultados se realizó por el test de Student:  $p < 0.05$  se consideró diferencia significativa.

En este experimento se corroboró que es posible potenciar la respuesta anti-HBsAg con la coinoculación por vía intranasal del HBsAg y el HBcAg. La respuesta de IgG en suero para los tres grupos inmunizados con ambos

antígenos fue significativamente superior a la que se obtuvo por inoculación del HBsAg en PBS y similar a la alcanzada por el grupo en que se inoculó al HBsAg en acemanano. Los valores de título obtenidos por la inoculación sistémica del HBsAg en alúmina tampoco difirieron significativamente de los grupos inoculados con acemanano por vía nasal y con alúmina por vía intramuscular. En el caso del grupo 4, la respuesta anti HBsAg disminuyó significativamente con respecto a la obtenida en el grupo 3, la diferencia entre ambos grupos reside en un incremento al doble en el grupo 4 con respecto a la cantidad de HBcAg inoculada. Este incremento puede reducir las posibilidades de penetración del HBsAg en la mucosa, disminuyendo de esta forma la respuesta al HBsAg.

#### **Ejemplo 4**

Con el objetivo de estudiar la interacción de diferentes antígenos particulados, se emplearon las partículas semejantes a virus del Virus del Papiloma Humano 16 (VLP del VPH 16), el HBsAg y el HBcAg. Se ensayaron 8 grupos de 6 ratones BALB/c hembras cada uno. El esquema que se siguió fue: inoculación los días 0 y 14 con una extracción a los 7 días de la segunda inoculación.

Como se puede apreciar al comparar en el primer gráfico la respuesta obtenida anti-HBsAg, cuando se inocular dicho antígeno mezclado con acemanano (grupo 6), es similar a la obtenida cuando se inocular con el HBcAg, (grupos 7) respectivamente. Lo cual constituye una tercera comprobación del efecto inmunopotenciador del antígeno de la nucleocápsida del VHB.

De este experimento se puede concluir además que ni el acemanano ni el HBcAg incrementan la respuesta de anticuerpos a las VLP de HPV, como se puede apreciar al comparar los grupos 4 y 5 con el 8, en el gráfico de la respuesta anti VLP del VPH. El análisis estadístico, utilizando el test t de Student ( $p < 0.05$  se consideró diferencia significativa), mostró que no existen diferencias significativas entre estos tres grupos.

Analizando la respuesta anti HBcAg del grupo 5, donde se inoculan solamente el HBcAg y las VLP de VPH, se puede encontrar que hay una disminución fuerte de la respuesta anti HBcAg con respecto al grupo 7

donde se introduce el HBcAg junto al HBsAg. La presencia de estas dos partículas por sí solas antagonizan a nivel de mucosa nasal. La respuesta anti HBcAg en el grupo 5 es significativamente inferior a la respuesta generada por el mismo antígeno en presencia del HBsAg (grupo 7). Sin embargo, en el grupo 2, con la adición del HBsAg se recupera la respuesta anti HBcAg de tal forma que se vuelve significativamente superior a la obtenida por el grupo 5 y no difiere significativamente de la respuesta anti HBcAg del grupo 7, donde este antígeno se encuentra junto al HBsAg, lo cual nos permite asumir la existencia de una interacción positiva del HBsAg con los antígenos de la cápsida del HPV y del VHB y de una interacción negativa entre los antígenos de la cápsida del VHB y del HPV. El efecto potenciador a nivel de mucosas puede ocurrir en ambas direcciones, lo cual posibilita el diseño de vacunas combinadas que tengan como núcleo al HBsAg o la combinación HBs/HBc.

Analizando la respuesta anti VLP, podemos apreciar que el efecto del HBsAg no sólo restablece la respuesta anti HBcAg como ocurre en el grupo 2 sino que potencia significativamente la respuesta anti VLP, como se puede apreciar cuando comparamos los grupos 1, 2 y 3 con el grupo 8 donde las VLP se encuentran en PBS. Entre los grupos 1, 2 y 3 no hay diferencias significativas y los tres son significativamente superiores al grupo 8.

Entre los grupos 1 y 3 donde el polisacárido se adiciona a la mezcla (grupo 1) o se tiene la mezcla de HBs y VLP solamente (grupo 3), no existieron diferencias significativas en cuanto a respuesta anti-HBsAg. Tampoco hubo diferencias en la respuesta anti HBsAg entre el grupo 3 y los grupos en que el HBsAg se inoculó con el acemanano o con el HBcAg (grupos 6 y 7). Estos resultados evidencian la existencia de un efecto inmunopotenciador de las VLP del VPH sobre el HBsAg.

Estos resultados avalan el uso de formulaciones combinadas por vía mucosal usando al HBsAg como antígeno central. También es atractiva la simple unión del HBsAg a las VLP de HPV y se hace real la posibilidad de potenciación de otros antígenos coadministrados con el HBsAg.

Estos antígenos, introducidos por vía nasal, tienen como ventaja la posibilidad de obtener formulaciones complejas en las que encontramos una

respuesta de anticuerpos que no disminuye con la introducción de nuevos antígenos (como por ejemplo las VLP de HPV al HBcAg y el HBsAg, grupo 2), comparado con formulaciones combinadas sencillas como HBsAg/HBcAg o formulaciones simples como HBsAg/Acemanano.


### DESCRIPCION DE LAS FIGURAS


**Figura 1.** Esquema de 3 dosis (0, 14 y 28 días). La extracción se realizó el día 42. Los grupos 1 y 2 fueron inoculados con 50µL por vía intranasal. El grupo 3 se inoculó por vía subcutánea con 100µL.

**Figura 2.** Esquema de 2 dosis (0, 14 días). La extracción se realizó el día 21. Los grupos 1, 2 y 3 fueron inoculados con 50µL por vía intranasal. El grupo 4 se inoculó por vía subcutánea con 100µL.

**Figura 3.** Esquema de 3 dosis (0, 14, 28 días). La extracción se realizó el día 26. Los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 fueron inoculados por vía intranasal con un volumen de 50µL. El grupo 6 se inoculó por vía intramuscular con 100µL.

**Figura 4.** Esquema de 2 dosis (0, 14 días). La extracción se realizó el día 26. Todos los grupos fueron inoculados por vía intranasal con un volumen de 50µL. La composición de los grupos ensayados se muestra en la tabla que encabeza la figura.

  
Lic. Mariela Vázquez Castillo  
Representante Legal, CIGB



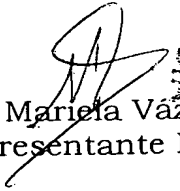



## REIVINDICACIONES

### FORMULACIONES CONTENIENDO PARTÍCULAS SEMEJANTES A VIRUS COMO INMUNOPOTENCIADORES POR VIA MUCOSAL.

1. Una formulación farmacéutica caracterizada porque sus componentes principales son a) el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B y b) el antígeno de la nucleocápsida del virus de la hepatitis B, una sustancia preservante y estabilizadores de dicha formulación.
2. Una formulación farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada porque sus componentes principales son a) el HBsAg y/o un derivado del HBsAg y b) HBcAg y/o un derivado del antígeno de la nucleocápsida del virus de la hepatitis B, una sustancia preservante y estabilizadores de dicha formulación.
3. Una formulación de acuerdo a la reivindicación 2, caracterizada porque el derivado del HBsAg y/o el HBcAg lo constituye un antígeno o porción del mismo, de cualquier naturaleza, insertado genéticamente, acoplado químicamente o adsorbido electrostáticamente a la estructura de cualquiera de los dos antígenos.
4. Una formulación de acuerdo a las reivindicaciones 1, 2 y 3, caracterizada porque se adiciona un antígeno homólogo u heterólogo, capaz de aprovechar la actividad inmunopotenciadora del HBcAg.
5. Una formulación de acuerdo a las reivindicaciones 2, 3 y 4, caracterizada porque el antígeno puede estar incluido dentro de la estructura de cualquiera de los antígenos particulados.
6. Una formulación de acuerdo a la reivindicación 5, caracterizada porque el antígeno atrapado es un ácido nucleico.
7. Una formulación de acuerdo a las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, y 6 para uso mucosal.
8. Una formulación de acuerdo a las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, y 6 para uso sistémico.
9. Una formulación de acuerdo a las reivindicaciones 1-7 para uso como vacuna terapéutica.

10. Una formulación de acuerdo a las reivindicaciones 1-7 para uso como vacuna preventiva.
11. Una formulación según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, y 5, caracterizada porque contenga al menos dos antígenos, uno de ellos el HBsAg y el otro un antígeno de nucleocápsida viral, para uso mucosal.
12. Una formulación según la reivindicación 11, caracterizada porque contenga como elemento inmunopotenciador un antígeno de nucleocápsida viral para administración mucosal.
13. Una formulación según la reivindicación 11, caracterizada porque contenga como elemento inmunopotenciador un antígeno de nucleocápsida viral para administración sistémica.
14. Una formulación según la reivindicación 11, caracterizada porque contenga como elemento inmunopotenciador al antígeno de nucleocápsida del VHB en mezcla simple sin que medien interacciones covalentes.
15. Una formulación de cualquier antígeno mezclado al HBsAg, para inmunización mucosal, que utilice el efecto inmunopotenciador del HBsAg por esta vía.
16. Una vacuna combinada cuyo antígeno central sea el HBsAg por vía mucosal.

  
Lic. Mariela Vázquez Castillo  
Representante Legal CIGB



**Primer Esquema**1-10 $\mu$ g HBcAg / acemanano 3mg/mL

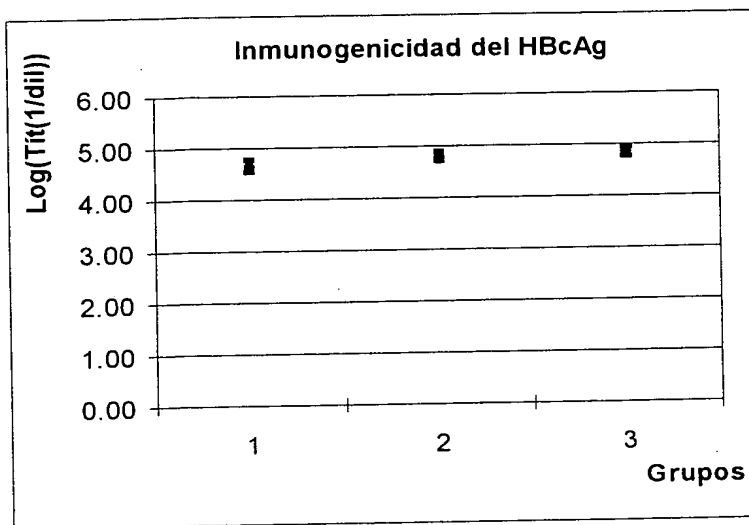
IN

2-10 $\mu$ g HBcAg / PBS 1X

IN

3-10 $\mu$ g HBcAg / alúmina 0.5mg/mL

SC

**Fig. 1**

*[Handwritten signature]*

*[Circular stamp]*

**Segundo Esquema**1-10 $\mu$ g HBsAg/ PBS 1X

IN

2-10 $\mu$ g HBsAg/ acemanano 3mg/mL

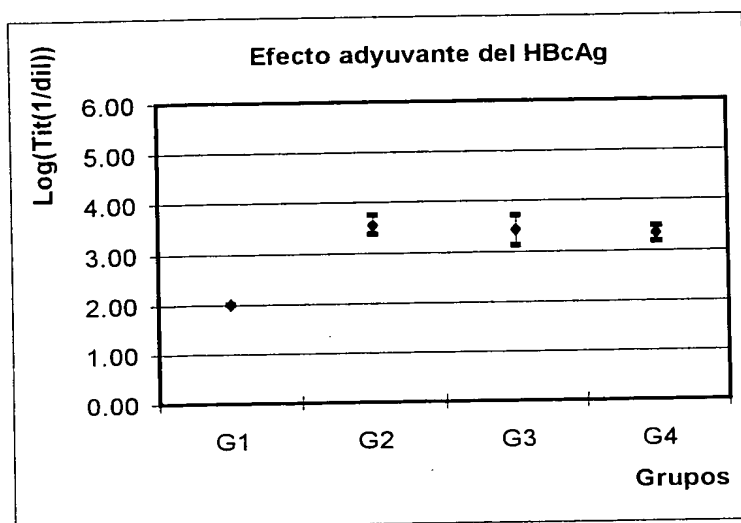
IN

3-10 $\mu$ g HBsAg/ 10 $\mu$ g HBcAg / PBS 1X

IN

4-10 $\mu$ g HBsAg/ Alúmina 0.5mg/mL

SC

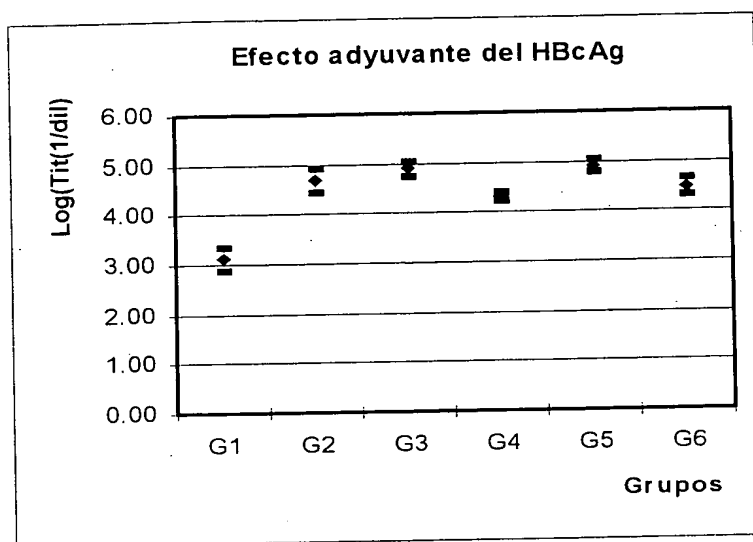
**Fig. 2**

*[Handwritten signature]*

*[Circular stamp: INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS]*

**Tercer Esquema**

- |                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 1- 5 $\mu$ g HBsAg / PBS 1X           | IN |
| 2- 5 $\mu$ g HBsAg / 5 $\mu$ g HBcAg  | IN |
| 3- 5 $\mu$ g HBsAg / 10 $\mu$ g HBcAg | IN |
| 4- 5 $\mu$ g HBsAg / 20 $\mu$ g HBcAg | IN |
| 5- 5 $\mu$ g HBsAg / acemanano 3mg/mL | IN |
| 6- 5 $\mu$ g HBsAg / alúmina 0.5mg/mL | IM |

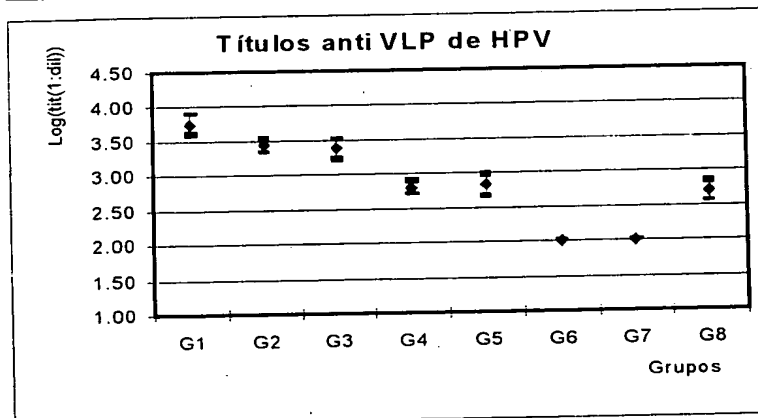
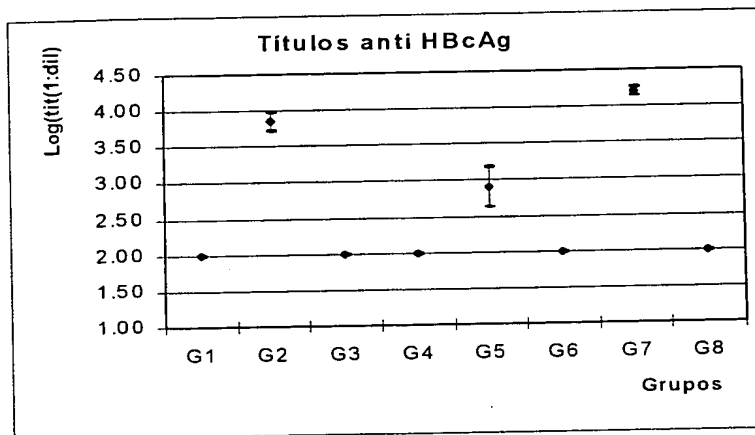
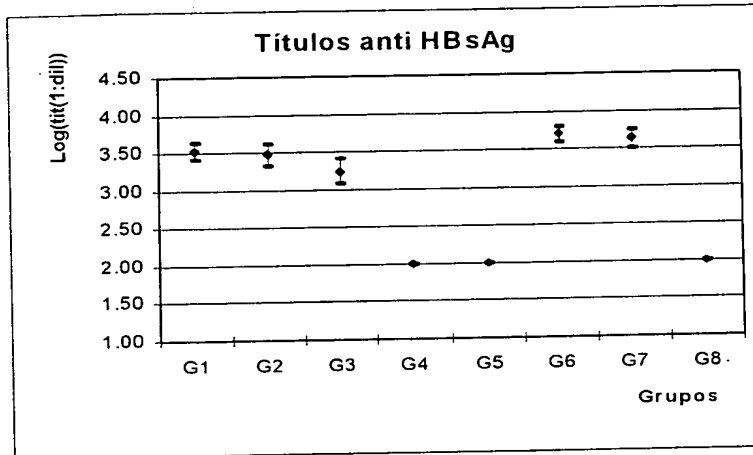
**Fig. 3**

*[Handwritten signature]*

*[Circular stamp]*

**Cuarto Esquema: Sinergismo a nivel mucosal.**

Acemanano 3mg/mL	X			X		X		
HBcAg 5µg/dosis		X			X		X	
HBsAg 5µg/dosis	X	X	X			X	X	
VLP /HPV 5µg/dosis	X	X	X	X	X			X



**Fig. 4** La composición, por grupos, en la parte superior de la figura.